

# 基于成分敲出/敲入模式辨识藜蒿叶抗白色念珠菌的药效物质

庞晨, 贤欢, 李慧, 潘思轶, 徐晓云\*

(华中农业大学 食品科学技术学院, 环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**[摘要]** **目的:**基于成分的敲出/敲入模式辨识藜蒿叶水提取物中抗白色念珠菌功效的主要活性物质。**方法:**对藜蒿叶水提取物中可溶性成分进行初步检测分析,并以 HPD600 型大孔树脂对藜蒿叶水提取物进行分离,基于成分敲出/敲入模式,用 30% 乙醇,50% 乙醇,70% 乙醇水溶液洗脱所得不同组分及其对应阴性样品作为研究对象,采用微量液基稀释法辨识藜蒿叶水提取物中对抗菌功效贡献最大的活性组分,并结合 HPLC-MS 进行初步的物质成分分析。**结果:**藜蒿叶水提取物可溶性成分中糖、蛋白等营养物质质量分数占 78% 左右,多酚类化合物占 16% 左右。藜蒿叶水提取物经 HPD600 型大孔树脂,70% 乙醇水溶液洗脱后所得组分 C 是藜蒿叶中主要的抗白色念珠菌(*Candida albicans*)药效组分,其抗白色念珠菌活性呈剂量依赖效应;质谱分析出组分 C 主要成分为丹参二萜醌类和萘啶酸类化合物,包括脱氢丹参酮 II<sub>A</sub>,丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 I,以及 3 种萘啶酸衍生物,以上物质均为首次从藜蒿植株中发现。**结论:**利用成分敲出/敲入模式辨别分析了藜蒿叶水提取物中抗白色念珠菌的主要药效组分,为进一步研究藜蒿叶水提取物具有抑菌活性的单体化合物提供了理论依据。

**[关键词]** 藜蒿; 白色念珠菌; 抑菌活性; 敲出/敲入模式; 药效物质

**[中图分类号]** R931.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0028-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240028

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1131.066.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-26 11:31

## Effective Constituents from *Artemisia selengensis* Leaves Against *Candida albicans* by Constituent Knock-out/Knock-in Strategy

PANG Chen, XIAN Huan, LI Hui, PAN Si-yi, XU Xiao-yun\*

(Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To recognize the main effective antifungal components against *Candida albicans* in *Artemisia selengensis* leaves. **Method:** The soluble components in water extract of *A. selengensis* leaves were preliminarily detected and analyzed, and then separated by HPD600 macroporous resin. Based on the knock-out/knock-in model, 30% ethanol, 50% ethanol, and 70% ethanol water solution were used to obtain different components and with their corresponding negative samples as the research object. Then the anti-fungal components in *A. selengensis* leaves were recognized by microdilution method, and HPLC-MS was combined for preliminary components analysis. **Result:** The contents of sugar, protein and other nutrients in water soluble components from water extract of *A. selengensis* accounted for about 78%, and polyphenols accounted for about 16%. The fraction C (70% ethanol elution) from *A. selengensis* leaves via HPD600 macroporous resin purification was the main anti-fungal component against *C. albicans* in a dose-effect dependence manner. Mass spectrometry analysis showed that fraction C was mainly of diterpenoid tanshinones and nalidixic acid compounds, including dehydrogenated

**[收稿日期]** 20170523(014)

**[基金项目]** 国家公益性行业(农业)科研专项(201303079)

**[第一作者]** 庞晨,在读硕士,从事天然产物化学研究,Tel:18612569603,E-mail:pangcc2825@163.com

**[通讯作者]** \*徐晓云,教授,博导,从事天然产物化学研究,Tel:027-87671056,E-mail:xuxiaoyun@mail.hzau.edu.cn

tanshinone II<sub>A</sub>, tanshinone II<sub>A</sub> and tanshinone I, as well as 3 kinds of nalidixic acid derivatives. The above substances were discovered from the *A. selengensis* for the first time. **Conclusion:** The main effective anti-fungal components against *C. albicans* in *A. selengensis* leaves were studied by constituents knock-out/knock-in strategy, providing the theoretical basis for the further study of monomeric compounds with antimicrobial activity from *A. selengensis* leaves extract.

**[Key words]** *Artemisia selengensis*; *Candida albicans*; antifungal activity; knock-out/knock-in strategy; effective contents

藜蒿别名芦蒿、萎蒿、水蒿等,是菊科蒿属的一种多年生草本植物,在我国南方地区,特别是湖南、湖北、安徽等地有大量人工种植。藜蒿具有特殊香气,富含蛋白、膳食纤维、多种维生素和矿物质,以及黄酮类化合物、酚酸等多种生理活性成分,其嫩茎鲜脆可口,全草可入药,具有消炎除湿功效,常用来治疗咳嗽、肝炎、痛经等疾病<sup>[1]</sup>。藜蒿既可以食用又具有一定的药用价值,是一种具有良好开发前景的药食同源植物资源。藜蒿具有广谱抗菌作用,对常见致病菌和食品腐败菌(包括细菌和真菌)均呈现不同程度抑制作用,已有报道指出,藜蒿具有抗白色念珠菌(*Candida albicans*)活性,其水提物和醇提物均可抑制 *C. albicans* 的生长,对抗 *C. albicans* 感染有一定的潜在价值<sup>[2]</sup>。但目前已有的关于藜蒿抗 *C. albicans* 活性的研究仅限于藜蒿全株的粗提物,抗菌活性物质尚未明确,抗菌活性也不甚理想。

目前国内外对于药效成分的研究多采用以下几种辨识模式,植物化学的分离及单一成分的基础活性探究;以动物实验为基础的活性药物成分筛选;以体外实验模型的活性为导向,广泛追踪分离纯化所得成分以辨识药效物质;基于数据库和计算机虚拟的功效成分筛选辨识模式<sup>[3-4]</sup>。然而以上的辨识模式均着重植物“部分”活性,忽略了复杂成分间的相互作用。以基因的敲除/敲入研究思路为基础,一些学者提出了一种将植物中不同组分看作不同的基因片段,将其从植物整体中敲出,再重新以不同剂量敲入,并追踪各敲出、敲入样品的活性,充分考虑了植物化学成分的整体与部分的联系<sup>[5-6]</sup>。基于成分敲出/敲入的药效物质识别模式目前主要用于中药药效成分的辨识。本研究基于成分敲出/敲入辨识模式,从绿色环保及工业生产成本角度,选择水提法制备藜蒿叶提取物,初步测定藜蒿叶水提物可溶性活性组分含量,以该水提物经 HPD600 型大孔树脂洗脱的不同组分作为研究对象,以不同敲出、敲入样品的抗 *C. albicans* 半数抑菌浓度(IC<sub>50</sub>)为指标,辨识藜蒿叶水提物中的抗 *C. albicans* 药效组分。并结合

HPLC-MS 对活性组分进行成分分析。旨在通过药效物质的明确与富集以提高藜蒿叶的抗 *C. albicans* 功效,从而对藜蒿资源的合理利用,发掘天然抗菌剂对抗 *C. albicans* 感染治疗提供理论依据。

## 1 材料

藜蒿采自湖北武汉市蔡甸区金鸡村藜蒿生产基地,选取 4 月份成熟的植株,经华中农业大学园艺林学学院蔬菜系汪李平教授鉴定为菊科植物藜蒿 *Artemisia selengensis* 的地上部分。白色念珠菌 *C. albicans*(批号 ATCC 90028,购自美国标准菌株贮藏中心)。

对照品芦丁(批号 1219061,纯度 ≥ 97%,美国 Sigma 公司);没食子酸、熊果酸、麦角固醇(批号分别为 28105, 1519045, 26374, 纯度分别为 99%, 98.5%, 95%,阿拉丁试剂有限公司);葡萄糖(批号 20140919,分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。苯酚,浓硫酸,硫酸铜,无水乙醇,硫酸钾,硝酸铝,氯化钠,亚硝酸钠,碳酸钠,香草醛,冰乙酸,高氯酸,乙酸酐,二甲基亚砜(DMSO),福林酚试剂,蛋白胨,琼脂(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),甲酸(色谱纯,上海安谱公司),氯霉素(美国 BBI 试剂有限公司),RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司)。

DHG-9123A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),BT224S 型电子分析天平(北京赛多利新科学仪器有限公司),Buchi 型真空旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司),LGJ-18S 型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司),Biospectrometer 型紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司),2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),1100 series 型高效液相-质谱联用仪(美国 Agilent 公司),SW-GJ-1FD 型超净操作台(苏州净化设备有限公司),DH3600B II 电热恒温培养箱(石家庄现代仪器仪表化工有限公司),Muliskan G0 型全波长读数仪(美国 Thermo 公司),B203 型普通生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司),TSF733002-2018 型立式蒸

气高压灭菌器(上海博迅实业有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 藜蒿叶水提物及敲出/敲入组分样品的制备

**2.1.1 藜蒿叶水提物样品的制备** 摘取藜蒿鲜叶, 50 °C 恒温烘干后粉碎, 过 60 目筛待用; 称取适量藜蒿叶粉末, 按料液比 1:15 用 80 °C 蒸馏水浸提 2 h 后过滤并收集滤液, 采用真空旋转蒸发仪浓缩; 藜蒿叶浓缩液冷冻干燥后即可得藜蒿叶水提物; 称取藜蒿叶水提物 8.00 g 至 200 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 得到藜蒿叶水提物样品(WE)。

### 2.1.2 藜蒿叶水提物不同组分敲出样品的制备

组分敲出: 称取 HPD600 型大孔树脂 80.0 g, 预处理后湿法装柱; 将藜蒿叶提取液 WE 200 mL, 以流速 2 BV·h<sup>-1</sup> 的流速通过色谱柱; 用蒸馏水以 2 BV·h<sup>-1</sup> 的流速清洗色谱柱, 至流出液呈无色为止; 分别用 30%, 50%, 70% 乙醇溶液以 2.5 BV·h<sup>-1</sup> 的流速通过色谱柱, 收集各组分流出液, 检测流出液在 330 nm 处的吸光度趋于平稳即洗脱完成, 分别得到 30%, 50%, 70% 乙醇洗脱液(以下分别称组分 A, B, C) 为不同组分的敲出样品; 并将上述组分分别作为敲出对象, 将其从藜蒿叶总水提物中敲出, 制备相应敲出组分的阴性样品(即总水提物中不含目标敲出组分的样品)。将各组分流出液用旋转蒸发仪除去乙醇后冷冻干燥, 得到各组分干燥样品待用。

称取藜蒿叶抗菌活性组分干燥样品 100.0 mg, DMSO 0.50 mL 溶解, 加超纯水定容至 10 mL, 经过 0.45 μm 滤膜后并超声脱气, 制备得到抗菌组分样品。

### 2.1.3 藜蒿叶水提物不同组分敲入样品的制备

将藜蒿叶水提物不同组分按其占总水提物中所占比例添加到阴性样品(不含 A, B, C 组分)中重组以还原总水提物, 得到藜蒿叶不同组分的敲入样品。将不同剂量(0, 0.5, 1, 2, 4 倍)藜蒿水提物抗菌活性组分敲入, 得到不同剂量的抗菌活性组分样品。

## 2.2 藜蒿叶总水提物主要可溶性成分的测定

**2.2.1 总糖含量的测定** 参照苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>, 以葡萄糖作为对照品。精密称定烘干至恒重的葡萄糖对照品 10.0 mg, 蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 制得 0.10 g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖对照品溶液。分别取葡萄糖对照品溶液 0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.10 g·L<sup>-1</sup> 以及样品溶液 0.10 mL 于试管中, 用蒸馏水补足至 1.00 mL, 分别加入 5% 苯酚溶液 1.00 mL, 然后迅速加入浓硫酸 5.00 mL, 摇匀后静置 10 min, 30 °C 水浴 20 min, 取反应液 200 μL 在

490 nm 处测定吸光度, 以葡萄糖对照品溶液浓度为横坐标, 对应吸光度为纵坐标, 作标准曲线, 由标准曲线和样品吸光度测定藜蒿叶水提物中的总糖含量。

**2.2.2 蛋白含量的测定** 采用凯氏定氮法<sup>[7]</sup>, 对该方法稍作修改后测定藜蒿叶水提物中的蛋白质含量。准确称取藜蒿叶水提物 0.50 g 于消化管中并标记, 再加入硫酸铜 0.30 g, 硫酸钾 3.00 g 和浓硫酸 10 mL。将消化管放到电炉上加热, 420 °C 下加热 3 h, 加热完毕后冷却至室温, 将消化管放入自动凯氏定氮仪中测定。

**2.2.3 总黄酮含量的测定** 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法<sup>[8]</sup>, 以芦丁作为对照品。精密称定芦丁对照品 10.0 mg 于烧杯中, 再准确加入 DMSO 1 mL 溶解后并转移至 100 mL 量瓶中, 蒸馏水定容摇匀, 制备得 0.10 g·L<sup>-1</sup> 芦丁对照品溶液。分别取 0.10 g·L<sup>-1</sup> 芦丁对照品溶液 0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80, 1.00 mL 以及样品溶液 0.10 mL 于试管中, 分别加入 5% NaNO<sub>2</sub> 2.00 mL 混匀后静置 6 min, 再加入 10% 硝酸铝溶液 0.20 mL, 混匀后静置 6 min, 加入 4% 氢氧化钠溶液 1.00 mL, 加蒸馏水补足至 2.50 mL, 混匀后静置 15 min, 取反应液 200 μL 在 500 nm 处测定吸光度, 以芦丁对照品溶液质量浓度为横坐标, 对应吸光度为纵坐标, 作标准曲线, 以标准曲线和样品吸光度计算藜蒿叶水提物中的总黄酮含量。

**2.2.4 总酚含量的测定** 采用福林酚比色法<sup>[9]</sup>, 以没食子酸为对照品。准确称取没食子酸对照品 10.0 mg 至于烧杯中, 再加入 DMSO 1 mL 溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容后摇匀, 制备得 0.20 g·L<sup>-1</sup> 的没食子酸对照品溶液。分别取 0.20 g·L<sup>-1</sup> 的没食子酸对照品溶液 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 mL 以及样品溶液 0.05 mL 于试管中, 加入 20% 福林酚溶液 3.50 mL, 摇匀后加入 10% 碳酸钠溶液 1.50 mL, 加蒸馏水补至 10 mL, 混匀后取反应液 200 μL 在 760 nm 处测定吸光度, 以没食子酸对照品溶液质量浓度为横坐标, 对应吸光度为纵坐标作标准曲线, 由标准曲线和样品吸光度测定藜蒿叶水提物中的总酚含量。

**2.2.5 总萜类含量的测定** 采用香草醛-高氯酸比色法<sup>[9]</sup>, 以熊果酸为对照品。准确称取熊果酸对照品 10.0 mg 于烧杯中, 再加入 DMSO 1 mL 溶解后转移至 100 mL 量瓶中, 蒸馏水定容后摇匀, 制备得 0.10 g·L<sup>-1</sup> 熊果酸对照品溶液。分别取 0.10 g·L<sup>-1</sup>

熊果酸对照品溶液 0.20, 0.40, 0.80, 1.20, 1.60, 2.00 mL 以及样品溶液 0.40 mL, 蒸干溶剂后加入 5% 香草醛-冰乙酸试剂 0.30 mL, 混匀后加入高氯酸溶液 1.00 mL, 60 °C 水浴 15 min 后冷却, 用冰乙酸补足至 10 mL 混匀, 取反应液 200  $\mu$ L 在 544 nm 处测定吸光度, 以熊果酸质量浓度为横坐标, 对应吸光度为纵坐标作标准曲线, 由标准曲线和样品吸光度测定藜蒿叶水提物中的总萜含量。

**2.2.6 总甾体含量的测定** 采用 Liebermann-Burchard 显色法<sup>[10]</sup>, 以麦角甾醇为对照品。精密称定麦角甾醇对照品 10.0 mg 于烧杯中, 再加入无水乙醇 1 mL 溶解后转移至 100 mL 量瓶中, 蒸馏水定容摇匀, 制备得 0.10  $g \cdot L^{-1}$  麦角甾醇对照品溶液。取乙酸酐 20 mL 密封冷却至 10 °C 以下, 加入浓硫酸 1.00 mL 摇匀后置于冰箱内冷却, 再加入冰乙酸 10 mL 得 Liebermann-Burchard 显色剂。分别精密吸取 0.10  $g \cdot L^{-1}$  麦角甾醇对照品溶液 2.00, 6.00, 12.00, 16.00, 20.00, 24.00 mL 以及样品 2.00 mL 于圆底烧瓶中, 旋转蒸发器蒸干溶剂后沿瓶壁缓缓加入显色剂 10 mL, 摇匀后 50 °C 水浴提取 40 min, 冷却至室温后取反应液 200  $\mu$ L 在 625 nm 处测定吸光度, 以麦角甾醇质量浓度为横坐标, 对应吸光度为纵坐标作标准曲线, 由标准曲线和样品吸光度测定藜蒿叶水提物中的总甾体含量。

采用上述方法测定藜蒿叶水提物中的总糖、蛋白质、总黄酮、总酚、萜类和总甾体含量, 重复 3 次, 并根据测定结果, 分别计算各成分在总提取物中的相对质量分数[相对质量分数 = (化学成分质量/提取物质量)  $\times$  100%]。

**2.3 抗 *C. albicans* 活性检测** 采用微量液基稀释法<sup>[11]</sup>测定各样品对 *C. albicans* 的  $IC_{50}$ : 将活化后的 *C. albicans* 菌体以 RPMI 1640 培养液配制并稀释为含菌量  $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的菌悬液; 无菌 96 孔板 1 ~ 11 号孔分别加入菌悬液 100  $\mu$ L 和藜蒿叶水提物待测药液(以无菌培养液配制) 100  $\mu$ L, 其中各孔药物浓度等度稀释为 0 ~ 6.4  $g \cdot L^{-1}$ , 12 号孔以无菌培养液代替药液作阳性对照, 同时以无菌培养液代替菌悬液添加对应浓度药物稀释液作对应的阴性对照; 采用酶标仪测定各孔在 600 nm 处吸光度, 所得不同浓度样品处理后菌液吸光度  $A_{\text{sample}}$ , 阳性对照菌液吸光度  $A_0$ , 阴性对照无菌培养液吸光度  $A_{\text{空}}$ , 计算出不同浓度样品对 *C. albicans* 生长抑制率(生长抑制率 =  $[(A_0 - A_{\text{sample}})/(A_0 - A_{\text{空}})] \times 100\%$ )。利用 SPSS 16.0 软件计算得出药物浓

度  $IC_{50}$ 。

**2.4 HPLC 对藜蒿叶水提物及敲出/敲入组分样品的谱峰分析** 使用 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-0.5% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 20% ~ 25% A; 10 ~ 20 min, 25% ~ 80% A; 20 ~ 30 min, 80% A; 30 ~ 40 min, 80% ~ 20% A), 流速 0.80 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 进样量 20  $\mu$ L, 柱温 30 °C, PDA 检测器, 检测波长 330 nm。

**2.5 藜蒿叶水提物抗菌活性组分的成分分析** 根据 2.4 项下结果, 将 2.1.2 项下制备的具有抗菌活性的敲出组分样品, 利用高效液相色谱-质谱联用方法(HPLC-MS)进行活性组分成分分析。

色谱条件: Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相乙腈(A)-0.5% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 30% ~ 50% A; 10 ~ 25 min, 50% A; 25 ~ 30 min, 50% ~ 30% A; 30 ~ 35 min, 30% A), 流速 0.40 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 进样量 20  $\mu$ L, 柱温 30 °C, PDA 检测器, 检测波长 210 nm, 扫描范围 200 ~ 400 nm。质谱条件: ESI 离子源, 干燥气流速 10 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 干燥气温度 350 °C; 喷射压力设定 241 kPa, 喷射电压 4 000 V, 质量扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 000, 正离子模式。

**2.6 数据分析** 所有实验均重复 3 次, 实验结果表述为平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )。方差分析均采用 SPSS 16.0 软件进行分析。使用中药指纹图谱相似度评价软件, 对不同敲入组分样品进行中药指纹图谱相似度评价。

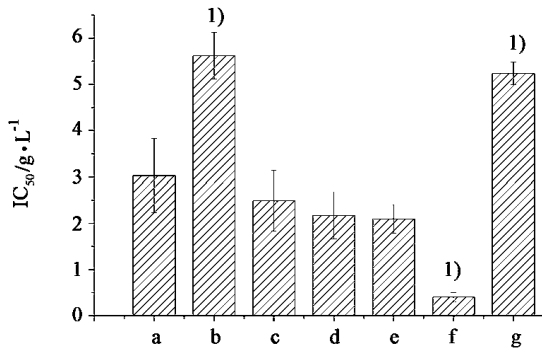
### 3 结果与分析

**3.1 藜蒿叶水提物主要可溶性成分总量的测定** 经测定计算可得藜蒿叶水提物中总糖占可溶性成分总量的(58.19  $\pm$  6.50)%, 蛋白质占(20.50  $\pm$  5.28)%, 总黄酮、总酚、萜类和总甾体分别占总量的(2.70  $\pm$  0.23)%, (5.02  $\pm$  0.87)%, (4.90  $\pm$  0.38)% 和(3.29  $\pm$  0.95)%。其中, 糖和蛋白质的总量可达藜蒿叶水提物可溶性成分总量的 78% 左右, 多酚类成分含量差别不大, 占总量的 16% 左右。

**3.2 基于敲出模式对藜蒿水提物抗菌活性组分的确定**

**3.2.1 藜蒿叶水提物不同组分敲出样品的抗 *C. albicans* 活性测定** 由图 1 可知, 组分 A 的  $IC_{50}$  显著高于总水提物, 则组分 A 与总水提物相比不具有抗 *C. albicans* 活性, 并产生反作用。可能由于在总水提物中营养物质成分如糖、蛋白等高达 78%, 组分 A 中大量的糖类物质为菌类生长提供了营养, 抗

菌活性降低。而组分 C 与总水提物相比  $IC_{50}$  具有极显著的差异 ( $P < 0.01$ ), 药效作用显著强于总水提物, 而且其对应阴性样品药效较弱, 故分离后组分的体外活性测定, 可确定某一组分是否为原物质的药效物质, 以组分药效评判标准为依据<sup>[12]</sup>, 可得出组分 C 是藜蒿叶水提物的抗 *C. albicans* 的主要活性部位。

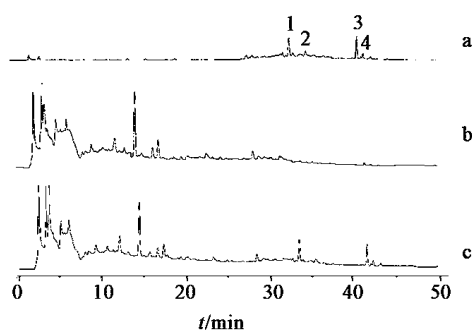


a. 总水提物; b. 样品 A; c. A 阴性; d. 样品 B; e. B 阴性; f. 样品 C; g. C 阴性; 相对于总水提物具有显著性差异<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 1 藜蒿叶水提物不同敲出样品对 *Candida albicans* 菌体生长抑制的  $IC_{50}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1  $IC_{50}$  of WE knocked-out samples on *Candida albicans* growth ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.2.2 基于 HPLC 对藜蒿叶水提物抗菌活性组分的特征谱带分析** 藜蒿叶水提物敲出的抗菌活性成分 C 经 HPLC 检测所得到的色谱见图 2。通过对比敲出组分与其对应阴性样品的 HPLC 色谱, 可找出敲出组分 C 的特征谱带。C 的特征谱带在 32.1 ~ 43.3 min, 主要的强吸收峰出现在 33.4, 35.3, 41.1, 41.9 min (图中 1 ~ 4 号峰位置)。



1 ~ 4. 强吸收峰 (图 4 同)

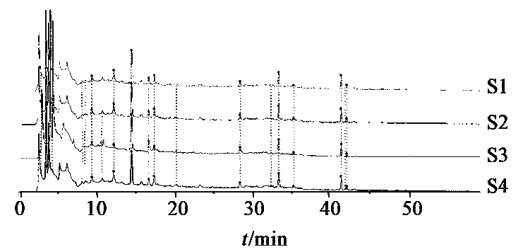
图 2 藜蒿叶水提物抗菌活性敲出样品 C (a), 其阴性样品 (b) 及 WE (c) 的 HPLC

Fig. 2 HPLC analysis of WE (c), knocked-out sample C (a) and its negative sample (b)

**3.3 基于敲入模式对不同组分敲入重组样品相似度评价及抗菌活性剂量关系的确定**

**3.3.1 藜蒿叶水提物不同组分敲入重组样品与原水提物的相似度评价** 将敲出的组分 A, B, C 按其在总水提物中所占比例重新敲入对应阴性样品中,

以还原总水提物, 并以原水提物为基准, 通过中药指纹图谱相似度评价软件, 得出重组样品与原水提物的相似度可达  $(92.18 \pm 2.95)\%$ 。说明通过敲出样品的重组可以有效还原水提物, 可以确保组分 C 以及其他组分的敲入样品与原水提物相比, 除了目标敲出成分以外的其他成分组成以及含量均一致, 从而保证抗菌活性能力测定比较的准确性。见图 3。

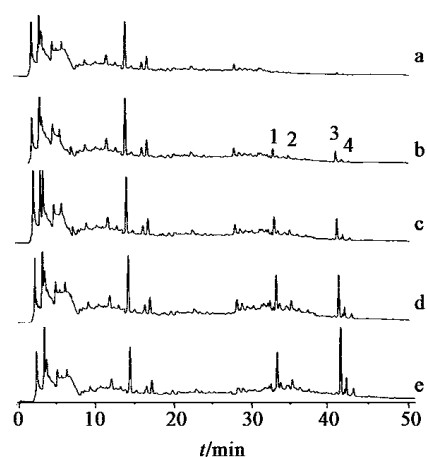


S1 ~ S3. 重组样品 A, B, C; S4. 总水提物

图 3 藜蒿叶水提物不同组分重组样品与原水提物的指纹谱相似度评价

Fig. 3 Similarity analysis of different recombinant samples and total water extract by chromatographic fingerprint evaluation method

**3.3.2 藜蒿水提物不同剂量组分 C 的敲入及其特征谱带分析** 将组分 C 按其在原藜蒿叶水提物中所占比例的 0, 0.5, 1, 2, 4 倍剂量敲入组分 C 的对应阴性样品中, 得到不同剂量的组分 C 敲入样品, 其 HPLC 色谱见图 4。由 3.2.2 项下可知组分 C 的特征谱带位置, 可以观察到随着 C 剂量的增加, 组分 C 特征谱带及最强吸收峰峰高增大, 则组分 C 在敲入样品中剂量关系稳定。



a. 组分 C 阴性; b ~ e. 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 倍组分 C (图 5 同)

图 4 不同剂量组分 C 敲入样品的 HPLC

Fig. 4 HPLC analysis of different samples of WE with different doses of fraction C knocked-in

**3.3.3 藜蒿叶水提物组分 C 抗 *C. albicans* 活性的剂量关系** 藜蒿叶水提物组分 C 的抗菌活性实验结果见图 5。由图 5 可知, 随着敲入样品中组分 C

剂量的增加, 敲入样品对 *C. albicans* 的  $IC_{50}$  逐渐减小, 即抗 *C. albicans* 活性逐渐增强。将敲入样品中组分 C 与原藜蒿叶水提物剂量比值做为自变量,  $IC_{50}$  作为因变量, 得到回归方程  $Y = -3.1704 \ln(X) + 5.0887 (r = 0.95)$ 。组分 C 的剂量与  $IC_{50}$  的回归分析进一步证明了组分 C 与藜蒿叶水提物的抗 *C. albicans* 活性相关, 且呈现剂量-效应关系。

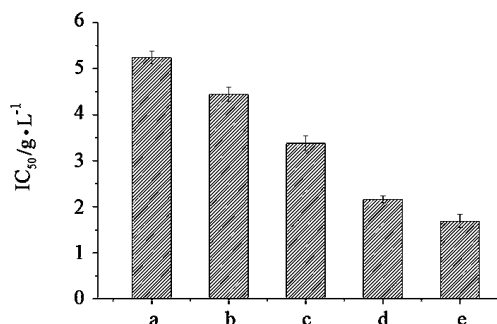


图 5 不同剂量组分 C 敲入样品对 *Candida albicans* 菌体生长抑制的  $IC_{50}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5  $IC_{50}$  of samples with different doses of fraction C knocked-in to *Candida albicans* inhibition ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 藜蒿叶水提物抗菌活性组分成分分析

#### 3.4.1 藜蒿叶水提物抗菌活性组分 C 的成分分析

表 1 组分 C 中各化合物的 HPLC-MS 信息

Table 1 HPLC-MS analysis of compounds in fraction C

化合物	出峰时间 /min	相对分子质量	化学式	化合物名称	$\lambda_{max}$ /nm	特征碎片离子 $m/z$
1	16.15	292	$C_{19}H_{16}O_3$	1,6,6-trimethyl-6,7-dihydrophenanthro-[1,2-b]furan-10,11-dione	228.0, 290.8	293, 275, 257, 247
2	17.28	294	$C_{19}H_{18}O_3$	1,6,6-trimethyl-6,7,8,9-tetrahydrophenanthro [1,2-b]furan-10,11-dione	271.8	295, 277, 259, 249
3	17.49	276	$C_{18}H_{12}O_3$	1,6-dimethylphenanthro-[1,2-b]furan-10,11-dione	250.5	277, 259, 249, 221, 231
4	19.08	182	$C_6N_4H_6OS$	4-mercapto-3,4-dihydropyr-imido[4,5-c]pyridazin-3-ol	280.1	183, 165
5	19.56	230	$C_{12}H_{10}N_2O_3$	7-methyl-4-oxo-1-vinyl-1,4-dihydro-1,8-naphthyri-dine-3-carboxylic acid	219.8, 302.7	231, 213, 203, 195, 185
6	22.47	228	$C_{14}H_{12}O_3$	6-methyl-1-oxo-4-vinyl-1,4-dihydronaphthalene-2-carboxylic acid	210.3, 288.4	229, 211, 201, 193, 183

化合物 2 在 ESI 离子源的作用下, 裂解产生了  $m/z$  295  $[M + H]^+$ , 277  $[M + H - H_2O]^+$ , 259  $[M + H - 2H_2O]^+$ , 249  $[M + H - H_2O - CO]^+$  等特征碎片离子。化合物 2 与文献报道的丹参酮 II<sub>A</sub> 裂解产生的特征碎片离子高度相符<sup>[13-15]</sup>, 其在正离子模式下, 由于 1 个或 2 个羰基的氧化失水, 产生了碎片离子  $m/z$  277 和 259; 而当 2 个羰基分别发生氧化和  $\alpha$  裂解反应时, 则产生了  $m/z$  249 碎片离子。故

利用 HPLC-MS 对藜蒿叶水提物抗菌活性组分 C 进行成分分析, 在正离子模式下的总离子峰见图 6。质谱图谱中, 组分 C 中各物质裂解产生的离子峰主要集中在 15 ~ 23 min, 对各离子峰的物质结构推断需进一步结合其对应的一级和二级碎片离子进行分析。

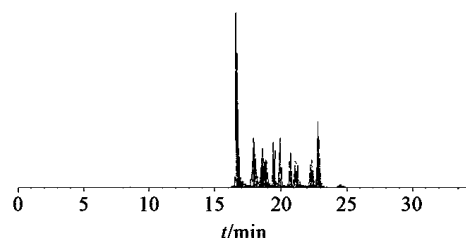


图 6 正离子模式下组分 C 的总离子流

Fig. 6 Total ion peak diagram of fraction C in positive ion mode

3.4.2 基于 HPLC-MS 结果的抗菌活性组分 C 结构解析 对组分 C 的质谱碎片离子分析, 可初步鉴定组分 C 中各化合物的结构, 组分 C 中的主要成分是萜类化合物, 包括一些丹参二萜醌类化合物, 脱氢丹参酮 II<sub>A</sub>, 丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 I, 以及萘啶酸类化合物。化合物信息见表 1。

推测化合物 2 可能为丹参酮 II<sub>A</sub>, 其裂解过程见图 7。

化合物 3 在 ESI 离子源的作用下, 裂解产生了  $m/z$  277  $[M + H]^+$ , 249  $[M + H - CO]^+$ , 259  $[M + H - H_2O]^+$ , 231  $[M + H - H_2O - CO]^+$  等特征碎片离子。化合物 3 符合丹参二萜醌类的裂解特征, 且由一级碎片离子判断化合物 3 的相对分子质量为 276, 与丹参酮 I 的相对分子质量相符, 产生的特征碎片离子也与丹参酮 I 具有极高的相似度<sup>[13]</sup>, 初步

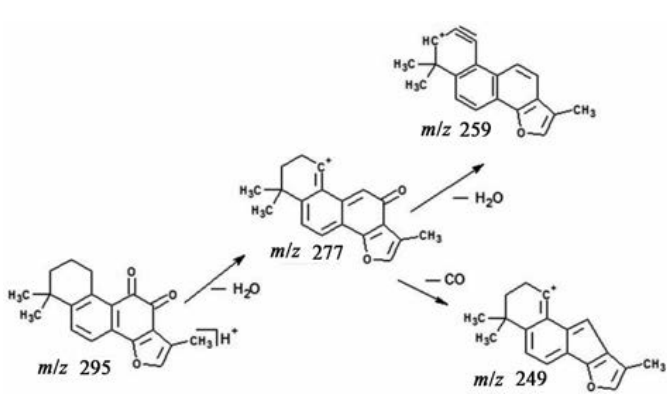


图 7 化合物 2 的主要裂解途径

Fig. 7 Main fragmentation pathway of compound 2

推断化合物 3 为丹参酮 I。其主要的裂解方式见图 8,产生的碎片离子可与化合物 3 的质谱碎片离子相对应,证明了推断的准确性。

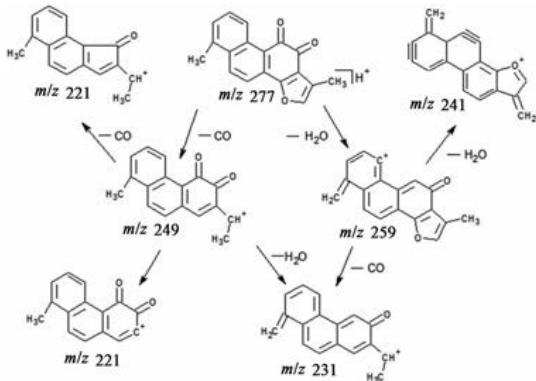


图 8 化合物 3 的主要裂解途径

Fig. 8 Main fragmentation pathways of compound 3

化合物 5 在 ESI 离子源的作用下,裂解产生了  $m/z$  231  $[M + H]^+$ , 213  $[M + H - H_2O]^+$ , 203  $[M + H - CO]^+$ , 185  $[M + H - H_2O - CO]^+$ , 195  $[M + H - 2H_2O]^+$  等特征碎片离子。其裂解方式符合二萘醌类化合物的裂解规律,与萘啶酸的裂解方式相似<sup>[16]</sup>,而相对分子质量与萘啶酸只相差 2,可能由侧链上的乙基被乙烯基取代而得,推测其为脱氢萘啶酸,分子式为  $C_{12}H_{10}N_2O_3$ 。其结构式及裂解过程见图 9。

#### 4 讨论

本实验首先对藜蒿叶水提物中可溶性成分进行测定分析,其中总水提物中总糖含量达到  $(58.19 \pm 6.50)\%$ ,总糖成分可能在抑菌实验中为菌类提供了营养成分。通过敲出/敲入模式确定了藜蒿叶水提物中的抗 *C. albicans* 活性组分 C,基于高效液相色谱以及质谱进行分析,发现其主要成分为萘类物质,包括首次发现并已进行结构解析的脱氢丹参酮 II<sub>A</sub>,丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 I,萘啶酸类化合物等。目前,对于藜蒿中未知成分的鉴定研究,多建立在

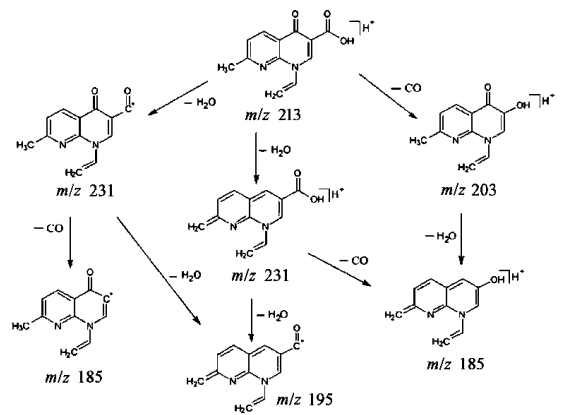


图 9 化合物 5 的主要裂解途径

Fig. 9 Main fragmentation pathways of compound 5

SPME-GC-MS 分析技术上,已鉴定出百余种挥发性化合物,包括一些单萜或倍半萜类化合物,如  $\alpha$ -蒎烯、柏木烯、金合欢烯、丁香烯、水芹烯等<sup>[17-20]</sup>。但目前对于藜蒿中非挥发性萘类物质的鉴定研究还较少,仅有 1 种从藜蒿中分离鉴定出的三萜类化合物——齐墩果酸<sup>[21]</sup>。本研究从藜蒿中分析出丹参二萘醌类及萘啶酸类物质,包括脱氢丹参酮 II<sub>A</sub>,丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 I,以及 2 种萘啶酸衍生物,以上物质均为首次从藜蒿植株中发现。

已有研究证实丹参酮类化合物具有较强的抗菌活性和抗痤疮效果<sup>[22-23]</sup>,丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 I 的抗 *C. albicans* 的抗菌活性也已被报道,且丹参酮 I 的抗菌活性较强,杀菌质量浓度  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[24]</sup>。萘啶酸作为一种治疗尿路感染的常规抗生素类药物,其对 *C. albicans* 也具有较强烈的抑制作用<sup>[25]</sup>。鉴于萘类化合物抗 *C. albicans* 活性的大量报道,以及 C 中已解析单体化合物丹参酮和萘啶酸类化合物的抗 *C. albicans* 活性研究,可以确定藜蒿水提物的抗 *C. albicans* 活性与这些萘类物质密切相关。

但对于本实验所定位到的抗菌活性组分 C 及其活性因子,则需要在柱色谱、高速逆流等分离技术的基础上<sup>[26-29]</sup>,对组分 C 进行分离纯化,将所得单体化合物在质谱和核磁共振技术的联合应用下得到全面的分子结构解析,进一步以单体化合物为基础进行抑菌活性研究,全面解析组分 C 的抗 *C. albicans* 活性。

#### [参考文献]

- [1] 贤欢,潘思轶,徐晓云. 藜蒿叶水提物对白色念珠菌的抗菌效应及强化措施[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 18-22.
- [2] 乔海霞,刘进军,张玉妥,等. 东北藜蒿提取物体外抗菌作用的初步研究[J]. 河北北方学院学报:医学版, 2008, 25(6): 13-15.

- [ 3 ] WU T,JIANG C,WANG L, et al. 3,5-Diarylpyrazole derivatives obtained by ammonolysis of the total flavonoids from *Chrysanthemum indicum* extract show potential for the treatment of Alzheimer's disease[J]. J Nat Prod,2015,78(7):1593-1599.
- [ 4 ] 李兴峰. 基于目标成分“敲出/敲入”的姜黄药效物质辨识与质量控制方法的初步研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2011.
- [ 5 ] KONG W J,ZHAO Y L,SHAN L M,et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from Radix Isatidis based on HPLC fingerprints and microcalorimetry[J]. J Chromatogr B,2008,871(1):109-114.
- [ 6 ] KONG W,WANG J,ZANG Q,et al. Fingerprint-efficacy study of artificial *Calculus bovis* in quality control of Chinese materia medica [J]. Food Chem, 2011, 127(3):1342-1347.
- [ 7 ] 谢笔钧,何慧. 食品分析[M]. 北京:科学出版社,2009:158-185
- [ 8 ] ZHANG L, TU Z C, YUANG T, et al. Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz[J]. Ind Crop Prod,2014,56(6):223-230.
- [ 9 ] 胡漫妮. 枇杷果核中三萜类物质与多酚的分析研究[D]. 广州:华南理工大学,2014.
- [ 10 ] 张鹏. 珊瑚状猴头菌子实体化学成分及总甾体含量测定的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [ 11 ] Freires I A,Murata R M,Furletti V F,et al. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil:antifungal activity and mode of action on *Candida* spp, and molecular targets affected in human whole-genome expression[J]. PLoS One,2014,9(6):1-13.
- [ 12 ] 肖小河,鄢丹,袁海龙,等. 基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的构建[J]. 中草药,2009,40(9):1345-1348.
- [ 13 ] 吴鹏,李慧芬,张学兰,等. HPLC-TOF/MS 分析丹参酒炙前后化学成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(11):6-9.
- [ 14 ] 刘劼,杨黄浩,黎先春,等. 高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析丹参中的丹参酮类化合物[J]. 质谱学报,2008,29(5):261-267.
- [ 15 ] 徐文. 液质联用技术在两种中药成分分析中的应用[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [ 16 ] XUE Q,QI Y,LIU F. Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of antibiotic residues in environmental waters[J]. Environ Sci Pollut R, 2015, 22(21):16857-16867.
- [ 17 ] HAN Y M. Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation[J]. Int Immunopharmacol,2005,5(6):1049-1056.
- [ 18 ] Picerno P,Mencherini T,Sansone, et al. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities [J]. J Ethnopharmacol,2011,138(3):705-712.
- [ 19 ] Braga P C, Dal Sasso M, Culici M, et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans* [J]. Fitoterapia,2007,78(6):396-400.
- [ 20 ] Zore G B,Thakre A D,Rathod V, et al. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole:inhibition of growth,dimorphism and sensitization[J]. Mycoses,2011,54(4):99-109.
- [ 21 ] Doke S K,Raut J S,Dhawale S, et al. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin[J]. J Gen Appl Microbiol,2014,60(5):163-168.
- [ 22 ] Olagnier D,Costes P,Berry A, et al. Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007,17(22):6075-6078.
- [ 23 ] DENG C,XU X,YAO N, et al. Rapid determination of essential oil compounds in *Artemisia selengensis* Turcz by gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction [J]. Analytica Chimica Acta,2006,556(2):289-294.
- [ 24 ] 徐莺,倪光远,陈清婵,等. 气相色谱-嗅觉测量法鉴定菱蒿中的香气化合物[J]. 园艺学报,2009,36(11):1676-1680.
- [ 25 ] 辛欣. 藜蒿三萜的提取、分离及保护肝脏功能的研究[D]. 南昌:南昌大学,2007.
- [ 26 ] 强喆,李晓明,郭文柱,等. 丹参酮包合物体外抑菌活性研究[J]. 西北农业学报,2013,22(5):196-203.
- [ 27 ] 刘文彬. 丹参酮外用的抗痤疮作用及薄荷醇增强其作用的机制研究[D]. 广州:广东药学院,2012.
- [ 28 ] 郑言博. 葱醌类化合物抗菌及抗肿瘤生物活性的研究[D]. 武汉:湖北工业大学,2012:8-25.
- [ 29 ] Sobieski R J,Brewer A R. Toxicity of nalidixic acid on candida albicans, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Kluyveromyces lactis*[J]. Antimicrob Agents Ch,1976,9(3):485-492.

[责任编辑 顾雪竹]